



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0054260  
Application Number.

출원 년 월 일 : 2003년 08월 06일  
Date of Application AUG 06, 2003

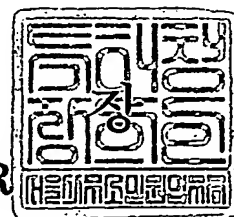
출원인 : 씨제이 주식회사  
Applicant(s) CJ Corp.



2004 년 07 월 22 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.08.06
【발명의 명칭】	알부민을 함유하지 않는 에리스로포이에틴 제제
【발명의 영문명칭】	Formulation of albumin-free erythropoietin
【출원인】	
【명칭】	씨제이 주식회사
【출원인코드】	1-1998-003466-9
【대리인】	
【성명】	손민
【대리인코드】	9-1999-000420-6
【포괄위임등록번호】	2002-028278-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조정원
【성명의 영문표기】	CHO, Cheong Weon
【주민등록번호】	670923-2552710
【우편번호】	463-776
【주소】	경기도 성남시 분당구 서현동(시범단지) 한양A 320-1605
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정순관
【성명의 영문표기】	CHUNG, Soon Kwan
【주민등록번호】	680406-1228413
【우편번호】	442-370
【주소】	경기도 수원시 팔달구 매탄동 원천 주공 아파트 106동 1304호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	구정
【성명의 영문표기】	KU, Jeong
【주민등록번호】	721120-1094612



30054260

출력 일자: 2004/7/23

【우편번호】	467-812
【주소】	경기도 이천시 마장면 덕평리 산522-1번지 기숙사 203호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	천준희
【성명의 영문표기】	CHEON, Jun Hee
【주민등록번호】	680715-1357612
【우편번호】	442-740
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영통동 황골마을 149동 904호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	안태군
【성명의 영문표기】	AN, Tae Kun
【주민등록번호】	750916-1538010
【우편번호】	585-806
【주소】	전라북도 고창군 고창읍 월곡리 662
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	전은경
【성명의 영문표기】	JEON, Eun Kyung
【주민등록번호】	760421-2522615
【우편번호】	449-718
【주소】	경기도 용인시 삼가동 진우아파트 104-2202
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	고재경
【성명의 영문표기】	KO, Jae Kyoung
【주민등록번호】	760706-2537017
【우편번호】	404-230
【주소】	인천광역시 서구 가정동 하나아파트 101동 1701호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김태형  
 【성명의 영문표기】 KIM, Tae Hyoung  
 【주민등록번호】 730303-1823616  
 【우편번호】 641-781  
 【주소】 경상남도 창원시 상남동 성원5차아파트 512동 2201호  
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 백영옥  
 【성명의 영문표기】 BEAK, Yeong OK  
 【주민등록번호】 620909-1927510  
 【우편번호】 442-370  
 【주소】 경기도 수원시 팔달구 매탄동 810-1 현대아파트 101동 508호  
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 서혜란  
 【성명의 영문표기】 SUH, Hea Ran  
 【주민등록번호】 600718-2475926  
 【우편번호】 137-773  
 【주소】 서울특별시 서초구 서초2동 우성아파트 501동 1608호  
 【국적】 KR

【심사청구】

청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
 손민 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	2 면	2,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	6 항	301,000 원
【합계】		332,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)\_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 혈액 유래 성분의 단백질을 함유하지 않는 안정화제를 사용함으로써 바이러스 감염 등의 문제점을 야기하지 않고 연장된 저장기간 동안 에리스로포이에틴의 활성을 유지하게 하는, 안정한 에리스로포이에틴의 용액 제제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 안정한 용액 제제는 추가로 비이온성 계면활성제 및 등장성 조절제를 함유함으로써 저장 동안 에리스로포이에틴의 손실을 막고 체내 투여를 용이하게 할 수 있다.

**【대표도】**

도 1

**【색인어】**

에리스로포이에틴, 용액 제제, 안정화제, 비이온성 계면활성제, 등장성 조절제, 하이드록시에틸 전분, 폴리솔베이트, 염화나트륨

## 【명세서】

### 【발명의 명칭】

알부민을 함유하지 않는 에리스로포이에틴 제제 {Formulation of albumin-free erythropoietin}

### 【도면의 간단한 설명】

도 1은 40℃에서 1주 동안 보관한 후, 하이드록시에틸 전분 (HES)의 농도에 따른 EPO 잔존율의 관계를 나타내는 그래프이다.

### 【발명의 상세한 설명】

#### 【발명의 목적】

#### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

2> 본 발명의 목적은 혈액 유래 성분인 알부민 또는 정제된 젤라틴을 대체할 수 있는 안정 화제를 선정하여 사용함으로써, 혈액 유래 성분의 단백질을 함유하지 않아 바이러스 감염의 우려 없이 장기간 보존이 가능하며, 생체내 효력을 보장하는 안정한 에리스로포이에틴 (erythropoietin; 하기 EPO로 인용됨) 용액 제제를 제공하는 것이다.

3> EPO는 콜로니 자극 인자(colony stimulating factor; CSF) 중 하나인 당단백질로써 신장에서 주로 생성되며, 간에서도 소량 생성되는 것으로 알려져 있다. EPO는 적혈구 계열의 전구 세포의 성장 및 분화를 촉진시켜 성숙한 적혈구의 생성을 도와주는 역할을 하므로, 신장기능

장해로 인한 빈혈, 골수이식성 빈혈, 류마티스성 빈혈, 암 또는 항암제 관련 빈혈, AIDS성 빈혈 등에 이용될 수 있고, 재생 불량성 빈혈 환자 및 만성 신부전증 환자 치료에 광범위하게 이용되고 있다.

<4>      상기 언급된 질환들의 치료를 위해서, EPO와 같은 단백질 약물을 시장에 제품으로 공급하기 위해서는 제제화 과정에서 나타날 수 있는 가수분해, 디설파이드 교환 반응, 변성, 응집, 흡착 등의 물리화화적인 변화를 억제하면서 생체내 효력을 유지시키는 것이 필수 조건이라 할 수 있다.

<5>      따라서, 당해 분야에서는 이러한 EPO 제제의 물리화화적 변화를 억제하면서 장기간 저장을 통해서도 생체내 효력을 유지시키기 위한 노력이 계속되어져 왔다. 상기와 같이 EPO 단백질 약물을 장기간 저장하면서 생체내 효력을 유지시키는 방법으로는 안정화제를 사용한 제제화 방법이 있을 수 있다.

<6>      예를 들면, 미국 특허 출원 제4,879,272호에서는 EPO 제제화 과정에 사람 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 레시틴, 덱스트란, 에틸렌 옥사이드 프로필렌 옥사이드 중합체, 하이드록시프로필 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 폴리옥시에틸렌 수소화된 피마자오일, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 성분을 사용함으로써 EPO의 변성 및 EPO 제제의 용기내벽에 대한 흡착을 방지할 수 있음을 기술하고 있을 뿐만 아니라, 흡착방지제로서의 사람 혈청 알부민의 농도와 EPO 흡착으로 인한 손실과의 관계에 대해서 기술하고 있다.

7>      상기 인용된 특허 출원과 같이, 기존의 단백질 약물의 제형에서 단백질 안정성을 개선하기 위하여 일반적으로 안정화제로 사람 또는 소 혈청 알부민, 정제된 젤라틴 등이 사용되었으나, 이러한 사람 혈청 알부민은 수혈에 의존한 혈액 유래 성분으로써 바이러스 감염의 우려가 상존하였다.

- <8> 이러한 문제를 극복하기 위하여, 단백질 약물 EPO에 대한 혈액 유래 성분을 사용하지 않는 안정화 방법에 관한 종래의 기술로서, 예를 들면, 미국 특허 출원 제4,992,419호에서는, EPO; 생리학적으로 적합한 인산염 완충액; 5 내지 50 g/L의 우레아; L-L-글리신, L-알라닌, L-아르기닌, L-류신, L-페닐알라닌, L-글루탐산, L-트레오닌 및 이들의 혼합물로 이루어진 1 내지 50 g/L의 아미노산; 폴리에틸렌 소르비탄 라우레이트, 소르비탄 트레올레이트 및 올레인산 폴리글리콜 에테르로 이루어진 폴리마크로콜 형태의 비이온성 계면활성제를 0.05 내지 5 g/L의 농도로 포함하는 생체 적합성 및 저장안정성 EPO 제제에 대한 발명이 기술되어져 있다. 상기 인용 특허는 알부민을 사용하지 않고도 저장시 안정한 EPO 단백질 제제화가 가능함을 제시하였다.
- <9> 또한, 미국 특허 출원 제6,120,761호에서는 사람 혈청 알부민이나 정제 젤라틴 등의 이종 단백질을 함유하지 않고, 로이신, 세린, 글루타민산, 아르기닌, 히스티딘 등의 아미노산을 안정화제로 사용함으로써 EPO 안정화를 유지하는 EPO 제제화 기술을 제시한 바 있다.
- 10> 또한, PCT 출원 WO 제0061169호에서는 pH 완충제, 소르비탄 모노-9-옥타데노에이트 폴리옥시-1,2-에탄디일 유도체, 그리고 아미노산 등으로 이루어진 EPO 안정화 제제를 기술한 바 있고, 바람직한 것으로써 인산 완충액과 폴리솔베이트 80, 글리신의 안정화제 조합으로 이루어진 EPO의 약제학적 조성물에 대한 발명을 기술하고 있다.
- 11> 또한, EPO 이외의 단백질 약물 안정화에 관한 종래의 기술로서, PCT 출원 WO 제0048635호 (EP 제1154796호)는 혈액응고인자 결핍에 사용되는 혈액성분 제제로 항혈우병인자인 제VIII 혈액응고인자를 포함하고, 알부민-비함유 동결건조된 혈액성분 제제를 기술하고 있으며, 구체적으로는, 상기 특허 출원에서는 제VIII 혈액응고인자와 만니톨, 글리신, 알라닌 등으로 구성된 4~10%의 중량제 (bulking agent)와 수크로오스, 트레할로스, 라피노오스, 아르기닌 등의



1~4%의 안정화제, 그리고 1 mM 내지 5 mM 칼슘 염, 100 mM 내지 300 mM 염화나트륨과 pH 6~8를 유지시켜 주는 완충제 (buffering agent) 조성을 사용하였으며, 2~6 % 하이드록시에틸 전분 (hydroxyethyl starch; 이후 HES로 인용됨)을 증량제 (bulking agent)로 적용함으로써 아미노산과 다당류 등의 안정화제와 증량제를 사용한 알부민 대체가능한 혈액성분 제제가 제공될 수 있다는 것을 기술하고 있다.

12> 또한, 미국 특허 출원 제5,358,708호에서는, 단백질 약물인 인터페론과 과립성 백혈구-대식세포 콜로니 자극 인자 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-SCF), 인터루킨 등의 안정화 및 보관 기간 연장을 위하여 메티오닌, 히스티딘 등을 안정화제로 사용하였다.

13> 미국 특허 출원 제4,457,916호에서는 대식세포에 의해서 체내에서 생성되는 단백질인 종양괴사인자 (tumor necrosis factor)를 수용액 및 분말 상태에서 안정화시키기 위한 방법으로 비이온성 계면활성제와 D-갈락토오스, D-크실로오스, D-글루쿠론산과 트레할로스, 텍스트란 및 HES의 성분 중 적어도 하나 이상의 혼합 성분을 사용하였다. 상기 언급된 바와 같이 당이나 당과 유사한 유도체에 의해 종양괴사인자를 열에 의한 전처리, 동결건조 및 반복적인 해빙을 통해서도 활성을 잃지 않고 장기간 보관을 가능하게 하는 수용액 및 분말 형태의 안정한 제제로 제형화하는 것이 기술되어 있다.

14> 그러나, EPO 단백질 제제를 안정화시키는데 있어서, 이를 동결건조시키는 경우에는 동결건조 과정이 물리화학적으로 상기 언급한 문제를 야기할 위험이 증가되는 것은 물론이고, 이러한 문제를 해결한다고 해도 동결건조물로서의 생산을 위한 생산 단가가 높아지는 문제점을 안고 있다.

<15> 따라서, 본 발명자들은 단백질 제제에 대한 안정화제로 사용되는 알부민을 대체할 수 있는 EPO 안정화제를 선정하여 사용함으로써 혈액 유래 성분의 단백질을 함유하지 않아 바이러스 오염의 우려가 없으면서, 장기간 보존이 가능하며 생체내 효력을 보장하는, 안정한 EPO 주사 제형의 용액 제제를 발명하고자 하였다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

16> 본 발명은 혈액 유래 성분의 단백질을 함유하지 않는 안정화제를 사용하여 바이러스 감염의 우려가 없고 연장된 시간 동안 활성을 유지하는, 에리스로포이에틴 (EPO), 알부민-비함유 안정화제, 비이온성 계면활성제 및 등장성 조절제를 포함하는 안정한 에리스로포이에틴 (EPO)의 주사용 용액 제제를 제공한다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

7> 당해 분야의 통상적인 숙련자에게 있어서, 상이한 단백질들은 이의 상이한 화학적 차이점으로 인해, 저장 동안 상이한 비율로 및 상이한 조건하에서 점진적으로 비활성화될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

> 즉, 안정화를 위해 사용되는 물질에 의한 저장기간 연장 효과는 상이한 단백질에 대해서 동등하지 않으며, 이로 인해 저장 안정성을 부여하기 위해 사용되는 안정화제는 목적 단백질의 종류에 따라 사용되는 비율 및 종류가 다양하고, 동일한 안정화제를 서로 다른 단백질에 대해서 사용하는 경우에는 저장 동안 저장 단백질의 본질이 변화하거나 농도가 변화하기 때문에 상이한 효과를 나타낼 것이다.

<19> 따라서, 본 발명은 EPO를 바이러스 오염의 우려 없이 연장된 기간 동안 효능을 유지시킬 수 있는 EPO의 안정한 용액 제제를 제공하기 위하여, 저장기간 동안 EPO를 안정화시킬 수 있는 비단백질성 안정화제를 선정하고자 하였다.

<20> 상기 목적을 달성하기 위하여 예의 연구를 수행한 결과, 본 발명자들은 안정화제로서 HES 또는/및 특정 아미노산을 부가함으로써 사람 혈청 알부민 또는 정제된 젤라틴 등의 이중 단백질을 함유하지 않아 바이러스 감염의 우려가 없고, 연장된 기간 동안 EPO의 효능을 유지시키는 안정한 EPO의 주사 제형의 용액 제제를 찾아낼 수 있었으며, 이로써 본 발명을 완성하였다.

1> 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "안정한" 또는 "안정화(제)"는 일정한 시간 동안 특정 저장 조건하에서 활성 성분의 손실이 특정량 미만, 일반적으로 10% 미만임을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 일반적으로, 10℃에서 2년, 25℃에서 6개월 또는 40℃에서 1 내지 2주 동안 EPO가 90% 이상, 바람직하게는 약 95% 정도의 잔존율을 유지하는 경우 이러한 제제는 안정한 것으로 이해할 수 있을 것이다.

> EPO와 같은 단백질에 있어서, 저장 안정성은 정확한 투여량을 보장하기 위해서 뿐만 아니라, EPO에 대한 항원성 형태 물질의 잠재적인 생성을 억제하기 위해서 중요하다. 저장 동안 EPO가 10% 정도의 손실을 나타내는 것은 조성물 내에서 응집체나 단편 등을 야기하여 항원성 화합물로 전환되지 않는 한 실질적인 투여시 허용할 만한 것으로 이해된다.

이하, 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다.

- <24> 한 가지 양태에 있어서, 본 발명은 치료학적 유효량의 EPO, 알부민-비함유 안정화제, 비이온성 계면활성제, 및 등장성 조절제를 함유함을 특징으로 하는, 안정한 EPO 용액 제제를 제공한다.
- <25> 보다 구체적인 양태에 있어서, 본 발명은 안정화제가 하이드록시에틸 전분 (HES), 또는 HES와 아미노산의 혼합물을 포함함을 특징으로 하는, EPO의 안정한 용액 제제를 제공한다.
- <26> 또한, 상기 양태에 있어서, 본 발명에서 사용되는 하이드록시에틸 전분 (HES)의 농도는 0.1 내지 10%가 바람직하며, 보다 바람직하게는 0.1 내지 3%이다.
- <27> 추가로, 본 발명의 안정한 EPO 용액 제제에서 추가의 안정화제로서 사용되는 아미노산은 글루탐산, 글루타민, 글리신 또는 그 염, 또는 이들의 혼합물로부터 선택될 수 있다.
- <28> 또한, 본 발명의 안정한 EPO 용액 제제에서 사용되는 비이온성 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페놀 에테르, 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 수크로오스 지방산 에스테르, 및 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체를 포함하는 비이온성 계면활성제로부터 선택될 수 있다.
- <9> 보다 바람직하게는, 비이온성 계면활성제는 폴리솔베이트 20, 80 또는 이들의 혼합물로부터 선택될 수 있다.
- > 또한, 본 발명의 EPO 용액 제제에서 사용되는 등장성 조절제는 염화나트륨, 만니톨, 솔비톨 또는 이의 혼합물로부터 선택될 수 있다.
- > 보다 바람직하게는, 등장성 조절제는 염화나트륨이다.

- <32> 보다 구체적인 양태에서, 본 발명에 따른 안정한 EPO 용액 제제는 당해 분야에 공지되어진 생리학적으로 허용되는 완충액에 용해된 용액 제제이다.
- <33> 보다 바람직하게는, 상기 완충액은 주사용수이다.
- <34> 본 발명의 전술한 목적 및 다른 목적, 특징 및 장점은 하기 상세한 설명, 실시예 및 첨부된 특허청구범위로부터 당해 분야의 통상적인 숙련자에게는 명백할 것이다.
- <35> 본 발명에서 사용되는 EPO는 천연 (natural) 또는 재조합 (recombinant) 기원 중 어떠한 방법으로 제조된 것이나 모두 가능하며, 천연 기원의 것으로는 혈액 또는 뇨 기원의 EPO가 될 수 있으며, 재조합 기원의 것으로는 유전공학적으로 형질전환된 포유류 세포의 배양액 기원의 EPO가 될 수 있다.
- 36> 본 발명의 EPO 용액 제제에 존재하는 EPO의 양은 치료학적 유효량이다. 일반적으로, EPO의 치료학적 유효량은 1회용 바이알 (single-use vial) 내에 약 2000 내지 10000 국제단위 (international unit, IU) 정도가 함유된 양이다.
- 37> 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 EPO 안정화제로는, 알부민과 젤라틴 등의 혈액 유래 성분을 포함하지 않는 약제학적으로 바람직한 조성물로서 단당류와 다당류를 포함하는 당류, 당알코올, 핵산을, 아미노산, 무기염, 유기염, 황을 포함하는 환원제, 계면활성제 및 킬레이트 화제 (chelating agent) 등을 예시할 수 있으며, 그 밖의 안정화제로 염기성의 아르기닌, 구아니딘, 또는 이미다졸 등과 폴리비닐 피롤리딘과 폴리에틸렌 글리콜과 같은 고분자와 글리실글리신 (glycylglycine), 글리실-L-글루탐산 (glycyl-L-glutamic acid) 등의 디펩타이드 등이 사용될 수 있다.

39> 또한, EPO 안정화제로서의 아미노산에는 종래에도 공지되어 있는 글리신, 알라닌, 라이신, 류신, 글루탐산, 아스파르트산, 히스티딘, 프롤린, 트립토판 등의 L, D형의 이성질체와 그 염을 포함하는 아미노산이 언급될 수 있다.

1> 사용가능한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페놀 에테르, 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 수크로오스 지방산 에스테르 등의 소수성(疏水性) 단위체와 친수성(親水性) 단위체와의 블록중합 또는 그래프트 중합에 의하여 합성된 고분자 활성제인 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 공중합체 등으로 이루어진 비이온성 계면활성제를 포함한다.

24-13

- <43> 본 발명에 따른 EPO의 안정한 주사 제형의 용액 제제는 안정화제 주성분인 HES와 또 다른 안정화제로서 아미노산을 포함하며, 등장성 조절제로서 염화나트륨, 만니톨, 솔비톨 또는 이들의 혼합물을 포함하며, 비이온성 계면활성제로서 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80 또는 이들의 혼합물을 포함하고 주사용수를 포함한다.
- <44> 보다 구체적으로, 본 발명에서 안정화제 주성분으로 사용된 HES는 아밀로펙틴 (amylopectin)의 알칼리 하이드록시에틸렌화 (alkaline hydroxyethylation) 과정으로 합성된 글루코오스 단위의 가지상 구조물로서, 혈장 증량제로 알부민이 69,000 g/mole의 분자를 갖는 단분산성 교질인데 반하여 HES는 다분산성 교질로써 중합체의 80%가 30~2,400,000 g/mole의 분자량을 가지며 본 발명에서 사용가능한 HES는 중분자량의 HES로서 평균 분자량이 200,000 g/mole에 이른다.
- <45> 본 발명의 안정한 EPO 용액 제제에 주성분으로 포함된 HES의 바람직한 농도는 0.1 ~ 10 % 이고, 보다 바람직하게는 0.1 ~ 3 % 이다.
- <46> 본 발명의 안정한 EPO 용액 제제에는 또 다른 안정화제로서, 아미노산 및 그 나트륨 염, 칼륨 염, 염산염 등의 염이 포함되며, 바람직한 아미노산은 글루타민, 글리신, 아르기닌, 프롤린, 글루탐산, 히스티딘, 필수아미노산의 일종인 이소류신, 류신, 리신, 페닐알라닌, 메티오닌, 트레오닌, 트립토판, 발린 및 그 염이 있다. 상기 언급된 아미노산 또는 그의 염은 1종 또는 2종 이상을 혼합하여 첨가하는 것이 또한 가능하다.

- <47> 특히 바람직하게는, 본 발명에 따른 안정화제로서의 아미노산은 L-글루탐산, L-글루타민, L-글리신 및 그 염이다. 이러한 아미노산의 1종 또는 2종 이상을 혼합하여 첨가하는 것이 가능하다.
- <48> 본 발명의 안정한 EPO 용액 제제에 추가될 수 있는 아미노산 양은 약 1 내지 20mg/ml의 범위이며 바람직하게는 약 2 내지 10mg/ml이다.
- <49> 본 발명에 따른 용액 제제에 사용하기 위한 바람직한 비이온성 계면활성제는 폴리솔베이트 20과 폴리솔베이트 80, 및 이들의 혼합물이다.
- <50> 본 발명의 안정한 EPO 용액 제제에서 사용되는 등장성 조절제는 염화나트륨, 만니톨, 솔비톨 또는 이의 혼합물로부터 선택될 수 있다.
- <51> 본 발명의 안정한 EPO 용액 제제는 일반적으로 약 5.0 내지 8.0의 pH 정도로 조절된다. 바람직한 pH 범위는 약 6.0 내지 7.0이다. 적합한 pH 조건은 등장성 조절제로서의 염화나트륨, 만니톨, 솔비톨 및 기타 대응 물질 같은 수성 완충액을 사용하여 달성할 수 있다.
- <52> 본 발명의 안정한 EPO 용액 제제는 일반적으로 밀봉, 멸균된 플라스틱 또는 플라스틱 또는 유리 용기 내에 함유될 수 있다. 본 발명의 용액 제제는 앰플, 바이알, 또는 1회용 주사기 내에 지정된 양으로 공급되거나 주사용 백 (bag) 또는 보틀 (bottle) 같은 다중 투여형으로 공급될 수도 있다.
- <53> 본 발명에서는 하기 실시예에서 구체적으로 설명되는 바와 같이, EPO 용액 제제를 40℃, 25℃의 가혹, 가속 안정성 시험 조건에서 일정기간 동안 보관한 후, EPO 용액 제제 각각의 잔존율로서 안정화제 선정 및 판단 기준으로 하였다.



<54> 보다 구체적으로, 안정화제의 주성분인 HES를 포함한 EPO 용액 제제를 제조하고, 40℃, 25℃에 일정기간 보관한 후, EPO 함량을 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (reverse phase high performance chromatography, RP-HPLC)를 사용하여 확인하였다. 그 결과, HES와 아미노산인 L-글루타민, L-글루탐산, L-글리신을 첨가한 용액의 EPO 잔존율이 높은 것으로 확인되어 EPO의 장기 안정성을 기대할 수 있었다.

<55> 본 발명에 따른 안정화제인 HES는 알부민 대체 가능하며, 비교적 독성이 없고, 저렴한 가격으로 쉽게 구할 수 있을 뿐만 아니라 수혈전파성 질환의 위험성도 없어 편리하게 이용할 수 있는 물질이다. 이에, 본 발명자는 주사 가능하며 당해 분야에서 혈장 증량제, 현탁제 및 동결 방지제로 사용되는 HES를 이용함으로써 장기 안정성을 갖는 EPO 용액 제제를 제조할 수 있음을 확인하였으며 이로써 본 발명을 완성하게 되었다.

<56> 이하, 본 발명은 하기 실시예에 의해 보다 상세하게 설명되지만, 이로써 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

#### 7> [실시예 1]

#### 8> HES의 농도에 따른 EPO 안정화 영향

특정 아미노산의 첨가 없이 농도 범위 0 % ~ 3 % (0g/L ~ 30g/L)의 HES를 함유하는 EPO 주사용액을 제조하여 제조하기 위하여, 주사용수 0.9L에 농도범위 0% ~ 3%의 HES를 넣어 70 ~ 5℃의 온도에서 20분 이상 교반하여 용해시킨 후, 35℃로 냉각시킨 이 용액에 염화나트륨, 폴리솔베이트 80를 가해 용해시켰다. 이에 주사용수를 첨가하여 최종적으로 1L 부피로 제조하여

교반한 후, 완충 용액으로 pH 6.9로 조정하였다. 이 용액을 0.22 mm 다공 크기의 막을 이용하여 여과 멸균한 용액에 필요한 EPO 양을 넣어 타입I 유리 바이알에 충전시켜 안정성 샘플을 제조하였다. EPO 양은 2000 ~ 10,000 국제단위 범위를 사용하였다.

<60> 제조된 안정성 샘플을 40℃에서 1 주일 동안 보관한 후, EPO의 잔존율을 RP-HPLC를 이용하여 평가하였다.

<61> HES 자체만의 적정 농도에서 EPO 안정화 효과를 확인하였으며, 장기 보존성이 기대되어 지는 결과는 표 1에 나타내었다.

<62> 【표 1】

상이한 HES 농도에 따른 EPO 용액 제제의 안정성 시험 결과

조성 (mg/mL)	실험예 1	실험예 2	실험예 3	실험예 4	실험예 5	실험예 6
염화 나트륨	9	9	9	9	9	9
폴리솔베이트 80	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
하이드록시에틸 전분 (HES)	-	2.5	5	10	20	30
40℃, ~1주 보관 후, EPO 잔존율 (%)	86	86	89	95	94	92

<63> 상기 표 1 및 도 1에서 나타낸 바와 같이, 특정 아미노산 비함유시, HES의 농도가 1 내지 3% 정도인 범위, 바람직하게는 1%의 농도에서 높은 잔존율을 나타냄을 확인 할 수 있었다.

4> [실시예 2]

5> HES와 아미노산을 포함한 용액의 등장성에 의한 영향

<66> 본 발명에 따른 EPO 주사 제형의 용액 제제를 제조하여 제조하기 위하여 순수한 물을 사용하였으며, 이러한 용액 제제를 등장성으로 만들기 위해 또한, 0.5 내지 10g/L의 염화나트륨, 또는 만니톨, 솔비톨 및 기타와 같은 대응되는 물질을 가하였다. 사용된 pH는 실시예 1에서와 마찬가지로 6.9로 조절하였다. 등장성에 따른 EPO 안정화 효과를 확인하기 위하여 하기 표 2에서 나타낸 바와 같은 양의 HES, 각기 다른 양의 염화나트륨을 함유하는 EPO 용액을 상기의 실시예 1에서 기술한 바와 같은 방법으로 제조하였다. 제조된 샘플을 삼투압 측정기 (freezing-point osmometer, 제조원: Gonotec GmbH)를 사용하여 측정하였으며, 40℃에서 2주간 보관한 후, RP-HPLC 분석법에 의한 EPO 잔존율을 평가하였다. 평가한 결과는 표 2에 나타내었다.

:67> 【표 2】

### 상이한 염화나트륨 농도에 따른 EPO 용액 제제의 안정성 시험 결과

조성 (mg/mL)	실험예 1	실험예 2	실험예 3	실험예 4	실험예 5
염화나트륨	4.874	6.355	7.796	9	9.257
폴리솔베이트 80	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
하이드록시에틸 전분 (HES)	60	60	60	60	60
글리신	5	5	5	5	5
삼투압	248	298	347	386	395
40℃ ~2주 후, EPO 잔존율 (%)	90	94	96	88	89

<sup>38></sup> 상기 표 2에서 나타낸 바와 같이, 실험예 2 및 3의 염화나트륨 농도에 따른 삼투압 298, 347 mOsm에서 94 및 96%의 특히 높은 안정성을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

19> [실시예 3]

<70> HES와 글루타민을 포함한 용액에서의 EPO 안정성 확인

<71> 안정화제 HES와 아미노산 글루타민을 포함하는 용액에서의 EPO 안정화를 확인하기 위하여, 1%의 HES와 8 mg/mL 농도의 글루타민을 상기의 실시예 1에서 기술한 바와 같이 제조하여, 40℃/RH75%, 25℃/RH60%의 항온항습기에 각각 2주, 6개월 보관한 후, EPO 잔존율을 RP-HPLC (Waters사) 분석법으로 평가하였다. 평가 결과는 표 3에 나타내었다.

## &lt;72&gt; 【표 3】

HES와 글루타민을 함유하는 EPO 용액 제제의 안정성 시험 결과	
하이드록시에틸 전분 (Hydroxyethyl starch, HES)	10 mg/mL
폴리솔베이트 80	0.5 mg/mL
염화나트륨	6.5 mg/mL
글루타민	8 mg/mL
주사용수	나머지
40℃ -2주 후, EPO 잔존율 (%)	91%
25℃ -6개월 후, EPO 잔존율 (%)	95%

<73> 평가 결과, 하이드록시에틸 전분과 글루타민을 포함한 조성에서 EPO의 초기 함량에 대한 잔존율이 40℃의 가혹조건에서 91%, 25℃의 가혹속조건에서 95% 잔존율을 나타내었다.

## &lt;74&gt; [실시예 4]

<75> HES와 글루탐산을 포함한 용액에서의 EPO 안정성 확인

<76> 안정화제 HES와 아미노산 글루탐산을 포함하는 용액에서의 EPO 안정화를 확인하기 위하여, 1%의 HES와 8 mg/mL 농도의 글루탐산을 상기의 실시예 1에서 기술한 바대로 제조하여

40℃/RH75%, 25℃/RH60%의 항온항습기에 각각 2주, 6개월 보관한 후, EPO 잔존율을 RP-HPLC (Waters사) 분석법으로 평가하였다. 평가 결과는 표 4에 나타내었다.

<77> 【표 4】

HES와 글루탐산을 함유하는 EPO 용액 제제의 안정성 시험 결과

하이드록시에틸 전분 (Hydroxyethyl starch, HES)	10 mg/mL
폴리솔베이트 80	0.5 mg/mL
염화나트륨	6.5 mg/mL
글루탐산	8 mg/mL
주사용수	나머지
40℃, ~2주 후, EPO 잔존율 (%)	94%
25℃, ~6개월 후, EPO 잔존율 (%)	96%

<78> 평가 결과, 하이드록시에틸 전분과 글루탐산을 포함한 조성에서 EPO의 초기 함량에 대한 잔존율이 40℃의 가혹조건에서 94%, 25℃의 가혹속조건에서 96% 잔존율을 나타내었다.

<79> [실시예 5]

<80> HES와 글루타민, 글리신을 포함한 용액에서의 EPO 안정성 확인

<81> 안정화제 HES와 아미노산 글루타민과 글리신을 포함하는 용액에서의 EPO 안정화를 확인 하기 위하여 1%의 HES와 8 mg/mL 글루타민, 2 mg/mL 글리신의 농도로 상기의 실시예 1에서 기술한 바대로 제조하여 40℃C/RH75%, 25℃/RH60%의 항온항습기에 각각 2주, 6개월 보관한 후, EPO 잔존율을 RP-HPLC (Waters사) 분석법으로 평가하였다. 평가 결과를 표 5에 나타내었다.

<82> 【표 5】

HES와 글루타민 및 글리신을 함유하는 EPO 용액 제제의 안정성 시험 결과	
EPO	2,000IU
하이드록시에틸 전분 (Hydroxyethyl starch, HES)	10 mg/mL
폴리솔베이트 80	0.5 mg/mL
염화나트륨	6.5 mg/mL
글루타민	8 mg/mL
글리신	2 mg/mL
주사용수	나머지
40℃, ~2주 후, EPO 잔존율 (%)	96 %
25℃, ~6개월 후, EPO 잔존율 (%)	95 %

<83> 평가 결과, 하이드록시에틸 전분, 글루타민 및 글리신을 포함한 조성에서 EPO의 초기 함량에 대한 잔존율이 40℃의 가혹조건에서 96%, 25℃의 가혹속조건에서 95% 잔존율을 나타내었다.

<84> 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 이해되어서는 안된다.

【발명의 효과】

<85> 본 발명의 EPO 용액 제제는 인간 혈청 알부민이나 젤라틴 등의 이종 단백질을 함유하지 않아 바이러스의 감염 우려가 없는 장기 안정성이 기대되는 제제이다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

주사용수 중 치료학적 유효량의 에리스로포이에틴 (EPO)과 함께 하이드록시에틸 전분 (HES), 또는 HES와 아미노산의 혼합물로 이루어진 알부민-비함유 안정화제를 함유함을 특징으로 하는, 에리스로포이에틴 (EPO) 용액 제제.

**【청구항 2】**

제1항에 있어서, 하이드록시에틸 전분 (HES)의 농도가 0.1 내지 10%임을 특징으로 하는, 에리스로포이에틴 (EPO) 용액 제제.

**【청구항 3】**

제1항에 있어서, 아미노산이 글루탐산, 글루타민, 글리신 또는 그 염, 또는 이들의 혼합물로부터 선택됨을 특징으로 하는, 에리스로포이에틴 (EPO) 용액 제제.

**【청구항 4】**

제1항에 있어서, 비이온성 계면활성제 및 등장성 조절제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 에리스로포이에틴 (EPO) 용액 제제.

**【청구항 5】**

제4항에 있어서, 비이온성 계면활성제가 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페놀 에테르, 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 수크로오스 지방산 에스테르, 및 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체를 포함하는 비이온성 계면활성제로부터 선택됨을 특징으로 하는, 에리스로포이에틴 (EPO) 용액 제제.

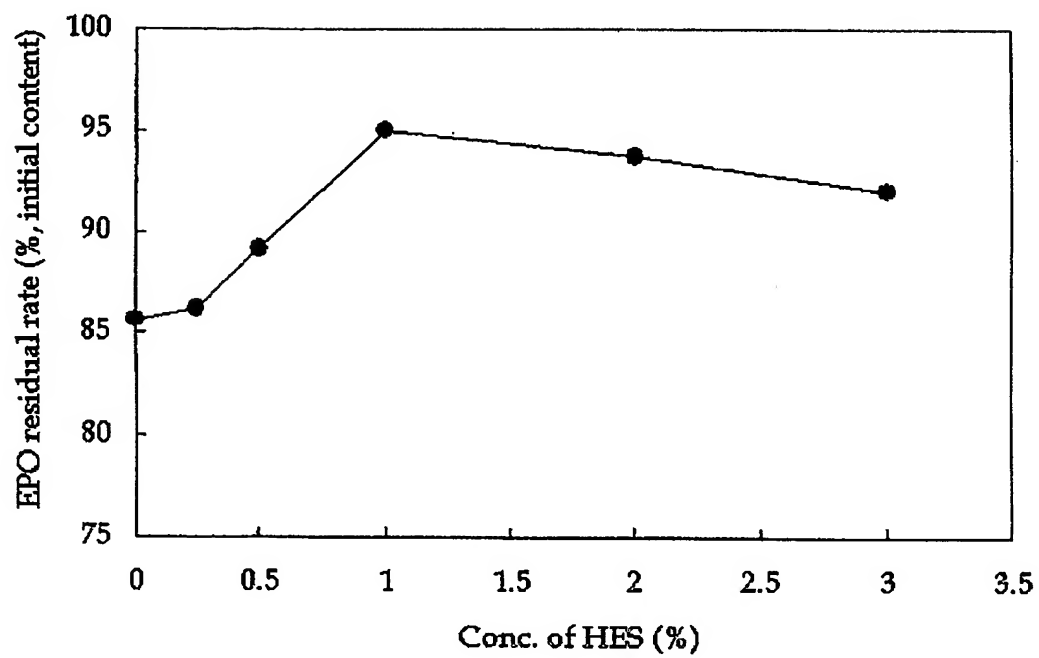
【청구항 6】

제4항에 있어서, 등장성 조절제가 염화나트륨, 만니톨, 솔비톨 또는 이의 혼합물임을 특징으로 하는, 에리스로포이에틴 (EPO) 용액 제제.



【도면】

【도 1】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

